



REC'D 16 NOV 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 02 JUIN 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • W / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 06 AOUT 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0309697 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 06 AOUT 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE LES LABORATOIRES SERVIER Direction Brevets 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) PEPTIDE-1			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE Cochez l'une des 4 cases suivantes			
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		LES LABORATOIRES SERVIER	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	12, Place de la Défense	
	Code postal et ville	92415 COURBEVOIE Cedex	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)		01.55.72.60.00 N° de télécopie (facultatif) 01.55.72.72.13	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page



**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DE PIÈCE
DATE **6 AOUT 2003**
LIEU **75 INPI PARIS**
N° D'ENREGISTREMENT **0309697**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)			
Nom		KUEHM-CAUBERE	
Prénom		Catherine	
Cabinet ou Société		LES LABORATOIRES SERVIER	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	12, Place de la Défense	
	Code postal et ville	9214115 COURBEVOIE Cedex	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.55.72.60.00	
N° de télécopie (facultatif)		01.55.72.72.13	
Adresse électronique (facultatif)			
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG [] [] [] [] [] []	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
 Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets			



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



REMISE DES PIÈCES DATE	6 AOUT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0309697
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		PEPTIDE-1	
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation	
		Date	
		Pays ou organisation	
		Date	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale	<input type="checkbox"/> Personne physique
		Nom ou dénomination sociale	
		Prénoms	
		Forme juridique	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	3-5, Impasse Reille	
	Code postal et ville	[7] [5] [0] [1] [4] PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		FRANCAISE	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville		
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	
Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention concerne un nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2, ainsi que les méthodes de criblage permettant d'identifier des molécules capables de moduler cette interaction.

La plupart des processus biologiques impliquent des interactions protéines-protéines. Un des objectifs fixés par la protéomique est la réalisation d'une carte de ces interactions. Celles-ci, impliquées dans la plupart des mécanismes de transductions de signal, sont des cibles de choix dans l'élaboration d'un médicament.

Il existe de nombreuses méthodologies permettant d'identifier des interactions protéiques. Une des plus répandues est le système du double hybride initialement développée et décrite par Fields et col. (US5,283,173, US5,468,614, US5,667,973).

Ce système consiste à la base en un test *in vitro* entre deux protéines recombinées. La première appelée « protéine appât » est une protéine chimérique fusionnée à un domaine de liaison de l'ADN (DNA binding domain/BD) capable de se lier en amont d'un gène reporter. Les domaines de liaison couramment utilisés sont ceux de Gal4 ou *E.coli* LexA.

La seconde protéine est également une protéine chimérique communément appelée « proie » qui contient un domaine d'activation (activation domain/AD), en général provenant de Gal4.

Cependant, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites. Il est par exemple bien connu que de tels criblages peuvent conduire à des faux positifs et/ou faux négatifs et des confirmations biochimiques des résultats obtenus sont nécessaires.

Une technique plus performante permettant de minimiser les faux positifs ou négatifs est décrite dans la demande de brevet WO9942612 et utilise des levures haploïdes recombinantes contenant les polypeptides « appât » et « proie ». Ce système permet la détection d'un plus grand nombre de « proies » à partir d'un « appât », de façon plus précise, plus reproductible et plus sensible que les autres méthodes conventionnelles utilisées dans le domaine.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire jouant un rôle crucial chez les organismes pluricellulaires. Il existe en effet deux formes de mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose. La nécrose se rencontre lors de lésions tissulaires : les cellules gonflent, conduisant à la fuite des constituants cellulaires puis à la lyse de la cellule, ce qui provoque une inflammation des tissus alentours.

Au contraire, l'apoptose est un processus physiologique programmé et régulé, dont on ne peut sous estimer l'importance puisque environ 10^9 de nos cellules meurent tous les jours par ce mécanisme. De nombreuses pathologies sont reliées à une dérégulation de l'équilibre existant entre la croissance, la survie et la mort cellulaire.

On peut citer en particulier les maladies autoimmunes, certaines maladies neurologiques et les cancers.

Maintenir une cellule en vie ou programmer sa mort nécessite au moins dix familles de protéines différentes, parmi lesquelles la famille Bcl-2 joue un rôle majeur. Cette famille contient environ vingt protéines parmi lesquelles Bcl-2 et Bcl-XL, protéines anti-apoptotiques favorisant la survie de la cellule, à l'inverse de Bax, Bak et Bid qui sont des protéines pro-apoptotiques. Au cours de l'apoptose, il semblerait que les membres de la famille Bcl-2 modifient leurs interactions avec leurs partenaires de façon à induire des changements irréversibles dans la cellule conduisant à la mort cellulaire.

Il est ainsi essentiel de pouvoir identifier des molécules capables de modifier ces interactions pour obtenir de réels candidats médicaments efficaces dans les pathologies impliquant des dérégulations de l'apoptose, notamment les maladies autoimmunes, certaines maladies neurodégénératives et les cancers.

La demanderesse a présentement identifié un nouveau peptide interagissant avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL.

Ce petit peptide de 22 acides aminés correspond au domaine précis d'interaction avec Bcl-2 et/ou Bcl-XL et possède les critères structuraux typiques d'un motif « BH3 », domaine d'interaction permettant la formation d'homo- ou d'hétérodimères.

La faible taille de ce peptide en fait un candidat idéal pour l'élaboration d'un test permettant le criblage hautement efficace de molécules capables de moduler les interactions entre ces protéines.

On trouve dans la littérature de nombreux tests de criblage de modulateurs d'interactions protéines-protéines mais ils présentent souvent des limites quant à leur sensibilité et leur faisabilité à haut débit. Les méthodes couramment utilisées nécessitent la mise en œuvre d'outils complexes (protéines de fusion, protéines recombinantes...) peu compatible avec un criblage à haut débit. Elles génèrent le plus souvent un bruit de fond important et sont peu fiables d'un point de vue quantitatif : elles présentent une fenêtre de lecture réduite ne permettant pas un criblage optimal des molécules testées.

La demanderesse a au contraire élaboré un test de criblage hautement efficace basé sur la polarisation de fluorescence (Owicki J.C. et al., Journal of Biomolecular Screening, 5, 2000, 297-306). Cette technique permet par exemple de mesurer l'interaction entre un ligand marqué avec un fluorophore et un récepteur. Le principe consiste à mesurer une augmentation de la polarisation de fluorescence émise par le ligand fixé à son récepteur comparée à celle émise par le ligand libre. La polarisation de fluorescence du ligand libre est dépendante de son poids moléculaire et sera d'autant plus importante que le poids moléculaire sera élevé. Ainsi lorsque ce test est réalisé avec un ligand de fort poids moléculaire, ayant une forte polarisation de fluorescence intrinsèque, il sera difficile d'apprécier de façon fiable la différence de polarisation de fluorescence entre le ligand libre et le ligand fixé. L'utilisation d'un ligand le plus petit possible permettra au contraire d'exacerber cette différence, et par conséquent d'augmenter la précision de l'essai. Il sera ainsi possible de mieux évaluer la réelle activité d'une molécule, et d'effectuer ces criblages à haut débit.

Plus particulièrement, la présente invention concerne le peptide comportant la séquence d'acides aminés de la figure 1 (SEQ ID N°1) ainsi que ses variants fonctionnels.

Par « variants fonctionnels », on entend tous fragments ou mutants ponctuels du peptide décrit dans la figure 1 capables d'interagir avec les protéines Bcl-2 et/ou Bcl-XL.

Ce peptide a été identifié par la méthode du double hybride en utilisant Bcl-XL et Bcl-2 en tant que protéines « appâts ». Trois banques de cDNA humains (placenta, cerveau, lignée cellulaire CEMC7) ont été criblées, et ont permis l'identification de fragments « proies »
5 correspondants à des séquences partielles de la séquence HC21ORF80 (Numéro d'Accession NM_015227).

Il a été ensuite déterminé expérimentalement par la technique du double hybride qu'un fragment de cette séquence est nécessaire et suffisant pour obtenir l'interaction avec Bcl-
10 XL et/ou Bcl-2, et correspond au fragment de 22 acides aminés décrit dans la figure 1.

L'interaction avec les protéines Bcl-2 et Bcl-XL a été validée par des techniques biochimiques (co-immunoprécipitation, GST pull-down) et l'activité biologique de ce peptide a pu être confirmée par transfections et/ou microinjections dans des cellules où il a été montré qu'il induisait l'apoptose.

15 La présente invention concerne également les séquences d'acides nucléiques déduites selon le code génétique de la séquence d'acides aminés de la figure 1 ainsi que de celles des variants fonctionnels décrits précédemment.

Plus particulièrement, l'invention concerne la séquence d'acide nucléique de la figure 2 (SEQ ID N°2) codant pour le peptide décrit dans la figure 1.

20 Par « séquences d'acides nucléiques », il doit être compris une séquence nucléique isolée de son contexte naturel. Il s'agit notamment de séquences isolées, amplifiées et/ou purifiées et éventuellement modifiées par génie génétique.

L'invention concerne aussi un vecteur recombinant comprenant une séquence d'acide nucléique selon l'invention.

Par vecteur, il faut comprendre tout type de vecteur permettant l'introduction de la séquence d'acide nucléique dans une cellule-hôte et l'expression du polypeptide.

La vecteur recombinant selon l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les séquences d'ADN nécessaires à l'expression des peptides selon l'invention et plus
5 particulièrement du peptide décrit dans la figure 1.

On peut citer en particulier les vecteurs dérivés des plasmides bactériens, les bactériophages, les plasmides et chromosomes de levure, les virus...

L'invention porte aussi sur les cellules-hôtes transformées par les vecteurs recombinants. Ces cellules sont préférentiellement des bactéries ou des cellules eucaryotes. On peut citer
10 à titre d'exemple *Escherichia coli*, les levures, les cellules d'insectes ou de mammifères.

L'invention porte par ailleurs sur un procédé de criblage d'agents capables de moduler l'interaction entre les peptides selon l'invention et plus particulièrement le peptide décrit dans la figure 1, et des protéines anti-apoptotiques et plus particulièrement Bcl-2 et Bcl-XL. Les agents modulateurs de ces interactions seront avantageusement des molécules
15 synthétisées chimiquement ou issues de banques de produits.

Le procédé de criblage selon l'invention contient les étapes suivantes :

- a) la préparation d'un peptide selon l'invention marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
20 d) la mesure de la polarisation de fluorescence.

L'invention concerne en particulier le procédé de criblage de molécules capables d'inhiber l'interaction entre le peptide et la protéine anti-apoptotique, comprenant les étapes suivantes :

- a) la préparation du peptide selon l'invention marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation ou non avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- 5 d) la mesure de la polarisation de fluorescence avec et sans le composé à tester ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement inférieure à celle observée sans le composé à tester.

L'invention concerne en particulier le procédé de criblage de molécules capables
10 d'augmenter l'interaction entre le peptide et la protéine anti-apoptotique, comprenant les étapes suivantes :

- a) la préparation du peptide selon l'invention marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation ou non avec le composé à tester ;
- 15 c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence avec et sans le composé à tester ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement supérieure à celle observée sans le composé à tester.

20 Selon un mode de réalisation préféré des procédés précédemment décrits, le marqueur de fluorescence sera par exemple Oregon Green, Bodipy ou la fluorescéine, et plus particulièrement la fluorescéine.

Le peptide selon l'invention utilisé dans les procédés de criblage sera préférentiellement le peptide décrit dans la figure 1.

25 Avantageusement, les procédés selon l'invention seront réalisés avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL.

Par conséquent, l'invention porte aussi sur l'utilisation des peptides selon l'invention pour le criblage selon les procédés de l'invention de molécules actives capables de moduler l'apoptose.

5 Plus particulièrement, l'invention concerne l'utilisation des peptides selon l'invention pour le criblage selon les procédés de l'invention de molécules utiles dans le traitement des pathologies impliquant une dérégulation de l'apoptose.

L'invention concerne donc l'utilisation des peptides selon l'invention pour le criblage selon les procédés de l'invention de molécules utiles dans le traitement des maladies autoimmunes, de certaines maladies neurologiques et des cancers.

10 **DESCRIPTION DES FIGURES**

Figure 1 : Séquence d'acides aminés du peptide interagissant avec Bcl-2 et Bcl-XL (SEQ ID N°1)

Figure 2 : Séquence d'acides nucléiques codant pour le peptide décrit dans la figure 1 (SEQ ID N°2)

Les exemples suivants illustrent l'invention et ne la limitent en aucune façon :

EXEMPLE 1 : Identification du peptide décrit dans la figure 1

Trois banques de cDNA humains ont été criblées (placenta, cerveau, lignée cellulaire CEMC7) par la technique du double hybride (Fields et col.) chez la levure en utilisant le
5 protocole de conjugaison (Legrain et col., Nature Genetics, 1997, 16, 277-282).

1) Préparation des « appâts » et « proies »

a) Les « appâts » utilisés sont : - Bcl-XL délétée de son extrémité C-terminale (1-209)
fusionnée au domaine de liaison à l'ADN LexA

- Bcl-2 délétée de son extrémité C-terminale (1-211)

10 fusionnée au domaine de liaison à l'ADN LexA.

Ils sont exprimés dans *Saccharomyces cerevisiae* (CG1945 ou L40ΔGal4) et mis en
préculture à 30°C dans un milieu synthétique dépourvu de tryptophane (DO-Trip)
jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} comprise entre 0,1 et 0,5. Cinquante ml d'une
dilution de cette préculture (DO_{600nm} = 0,006) sont incubés à 30°C pendant une nuit.

15 b) Une collection de levures contenant les plasmides exprimant les banques de cDNA
fusionnés au domaine d'activation de la transcription Gal4 est obtenue par
transformation après sélection sur un milieu dépourvu en leucine (DO-Leu). Ces
levures sont aliquotées et conservées à -80°C.

2) Conjugaison

20 La conjugaison est réalisée avec un ratio « appât »/ « proie » égal à 2.

Une quantité de cellules de « levure-appâts » obtenues au stade 1)a) correspondant à 50
unités DO_{600nm} est mélangée aux « levure-proies » obtenues au stade 1)b). Après
centrifugation, le culot est resuspendu dans un milieu YPGlu, étalé sur des boîtes de

culture YPGlu et incubé 4 heures 30 à 30°C. La sélection des levures conjuguées contenant un « appât » et une « proie » capables d'interagir ensemble est réalisée sur un milieu DO-Leu-Trp-His : l'absence de leucine et de tryptophane permet de maintenir une pression de sélection ne permettant qu'aux levures contenant les deux types de plasmides (« appâts »/« proies ») de pousser ; l'absence d'histidine dans le milieu permet de sélectionner les levures conjuguées contenant un plasmide « appât » et un plasmide « proie » capables d'interagir ensemble : cette interaction permet d'activer le gène HIS3 codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'histidine.

3) Identification des clones positifs

Les fragments « proie » d'une colonie de levures sélectionnées selon 2) sont amplifiés par PCR à partir d'un lysat brut de cette colonie, en utilisant des amorces spécifiques du vecteur « proie » :

ABS1 5'-GCTTTGGAATCACTACAGG-3'

ABS2 5'-CACGATGCACGTTGAAGTG-3'.

Les produits de PCR sont ensuite séquencés et les séquences obtenues sont identifiées par comparaison avec des banques de données.

Parmi les clones positifs obtenus, des fragments de 300 acides aminés environ ont pu être identifiés comme étant des séquences partielles de la séquence HC21ORF80 (Numéro d'Accession : NM_015227).

4) Identification du peptide décrit dans la figure 1

Des expériences de double hybride réalisées selon les stades 1), 2) et 3) précédemment décrits à partir de plus petits fragments de la séquence HC21ORF80 ont permis d'identifier un petit peptide de 22 acides aminés comme étant nécessaire et suffisant pour obtenir l'interaction avec Bcl-XL et Bcl-2 : Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-Phe-Arg-Ser-Arg.

EXEMPLE 2 : Validation de l'interaction entre le peptide décrit dans l'Exemple 1 et Bcl-2 et/ou Bcl-XL

1) GST « pull-down »

L'interaction entre le peptide obtenu dans l'Exemple 1 et Bcl-2 et/ou Bcl-XL est validée par mesure du déplacement de l'interaction entre une protéine à motif « BH3 ». Bid et la protéine de fusion GST-Bcl-2 ou GST-Bcl-XL.

a) Synthèse de Bid radiomarquée

La protéine marquée est obtenue en utilisant le kit TNT Quick Master (Promega). Quarante µl de mélange TNT sont incubés pendant 90 minutes à 30°C avec 2 µl (équivalent à 20 µCi) de ³⁵S-méthionine (Amersham), 1 µg d'ADN plasmidique codant pour Bid et de l'eau en quantité suffisante pour atteindre un volume de 50 µl.

Le nombre de fmoles/ µl de protéine radioactive produite est calculé à partir du nombre de méthionines dans la protéine.

b) GST « pull-down »

Quatre fmoles de protéine Bid radioactive sont incubées à 4°C pendant 3 heures avec 3 µg de la protéine de fusion glutathion-S-transférase-Bcl-XL (GST-Bcl-XL) ou glutathion-S-transférase-Bcl-2 (GST-Bcl-2) ou GST seule dans 300 µl de tampon de liaison (142 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM tampon Hepes, 0,5 mM DTT, 1 mM EDTA, inhibiteur de protéases, pH 7,4) et 0,4% de Triton X100. Les billes de « glutathione sepharose 4 fast flow » (Amersham) sont lavées 3 fois dans le tampon de liaison et remises en suspension dans ce tampon de façon à obtenir une solution à 50%. 20 µl sont ajoutés à chaque échantillon et incubés sous rotation à 4 °C pendant 1 heure. Les billes sont ensuite lavées 3 fois dans le tampon de liaison, puis 25 µl de tampon 2x SDS, Laemmli (Sigma) sont ajoutés. Les échantillons sont placés 5 minutes à 95°C puis déposés sur un gel à 12% Tris-Glycine (Invitrogen). Après électrophorèse, le gel est ensuite incubé dans une solution de séchage (Invitrogen) pendant 30 minutes, puis séché pendant 150 minutes à 70°C. Les protéines radioactives sont révélées par exposition d'un film

Kodak BioMax MS-1 (Sigma). Pour effectuer le test de compétition avec le peptide à tester, celui-ci est ajouté à la solution initiale avec des concentrations allant de 1 à 100 μM .

c) Résultats

Lorsqu'on ajoute à la solution initiale le peptide obtenu dans l'Exemple 1, le signal autoradiographique de Bid disparaît. Ce résultat montre que le peptide obtenu dans l'Exemple 1 inhibe l'interaction entre Bcl-2 et Bid et entre Bcl-XL et Bid.

2) Polarisation de fluorescence

Une solution contenant 1 à 100 nM du peptide obtenu dans l'Exemple 1 marqué à la fluorescéine à l'extrémité N-terminale est mélangée à une solution contenant la protéine de fusion GST-Bcl-XL ou GST-Bcl-2 à la concentration de 0,1 à 1 μM dans un tampon contenant Na_2HPO_4 20 mM pH 7,4, de l'EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, de l'acide pluronique F-68 0,05%. La polarisation de fluorescence est ensuite mesurée par l'appareil En Vision (Packard Perkin-Elmer).

Résultats : Une augmentation significative de la polarisation de fluorescence est observée lorsque le peptide obtenu dans l'Exemple 1 est incubé avec les protéines de fusion contenant Bcl-XL et Bcl-2 attestant de sa fixation sur ces protéines.

EXEMPLE 3 : Test de criblage de molécules capables d'inhiber l'interaction entre Bcl-2 et/ou Bcl-XL et le peptide obtenu dans l'Exemple 1

Les produits à tester sont distribués dans des plaques 384 puits (Corning Flat Bottom) à une concentration finale de 10 $\mu\text{g/ml}$. Un puits est rempli avec une quantité équivalente de tampon/solvant sans composé à tester et constituera le témoin. Le peptide obtenu dans l'Exemple 1 marqué à la fluorescéine est ajouté dans chaque puits de manière à obtenir une concentration finale allant de 1 à 100 nM. La protéine de fusion GST-Bcl-XL ou GST-Bcl-2 est ensuite ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 0,1 à 1 μM dans un

5 tampon contenant Na_2HPO_4 20 mM pH 7,4, de l'EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, de l'acide pluronique F-68 0,05%. La polarisation de fluorescence est ensuite mesurée par l'appareil En Vision (Packard Perkin-Elmer). Une diminution significative de la polarisation de fluorescence enregistrée dans l'essai réalisé avec le composé à tester comparée à celle obtenue sans le composé à tester (puits témoin) permet de conclure à une activité inhibitrice de la molécule. A l'inverse, une augmentation significative de la polarisation de fluorescence dans l'essai avec le produit à tester comparée au témoin permet de conclure à une activité activatrice de la molécule.

REVENDICATIONS

1. Peptide interagissant avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et/ou Bcl-XL caractérisé par la séquence suivante (SEQ ID N°1) : Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-Phe-Arg-Ser-Arg .
- 5 2. Peptide caractérisé en ce qu'il correspond à un fragment ou à un mutant ponctuel du peptide selon la revendication 1 et en ce qu'il présente une interaction avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et/ou Bcl-XL .
3. Séquence d'acides nucléiques codant un peptide selon la revendication 1 caractérisée par la séquence suivante (SEQ ID N°2) :
10 5'-GATACCCGTCGCAGCATGGTGTTTGCCAGGCACCTGCGGGAGGTGGGAGA
CGAGTTCAGGAGCAGA -3'.
4. Séquences d'acides nucléiques déduites selon le code génétique de la séquence d'acides aminés selon la revendication 1.
5. Séquences d'acides nucléiques déduites selon le code génétique de la séquence
15 d'acides aminés selon la revendication 2.
6. Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides nucléiques selon l'une des revendications 3 à 5.
7. Vecteur recombinant selon la revendication 6 caractérisé en ce que le vecteur est un plasmide comprenant les séquences nécessaires à l'expression du peptide dans une cellule-
20 hôte.
8. Cellule-hôte caractérisée en ce qu'elle est transformée par le vecteur recombinant selon l'une des revendications 6 ou 7.

9. Procédé d'identification de molécules capables de moduler l'interaction entre un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 et une protéine anti-apoptotique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la préparation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence.

10. Procédé d'identification de molécules capables d'inhiber l'interaction entre un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 et une protéine anti-apoptotique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la préparation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec ou sans le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement inférieure à celle observée sans le composé à tester.

11. Procédé d'identification de molécules capables d'augmenter l'interaction entre un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 et une protéine anti-apoptotique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la préparation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 marqué avec un marqueur de fluorescence ;
- b) l'incubation avec ou sans le composé à tester ;
- c) l'ajout de la protéine de fusion contenant la protéine anti-apoptotique ;
- d) la mesure de la polarisation de fluorescence ;
- e) la sélection des molécules pour lesquelles l'augmentation de la polarisation de fluorescence observée avec le composé à tester est significativement supérieure à celle observée sans le composé à tester.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel le peptide utilisé est caractérisé par la séquence SEQ ID N°1.

13. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel le marqueur de fluorescence utilisé est la fluorescéine.

5 14. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11 dans lequel la protéine anti-apoptotique est Bcl-2 ou Bcl-XL.

15. Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour l'identification selon le procédé d'une des revendications 9 à 11 de molécules modulatrices de l'apoptose.

10 16. Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour l'identification selon le procédé d'une des revendications 9 à 11 de molécules utiles dans le traitement des pathologies impliquant une dérégulation de l'apoptose.

17. Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 ou 2 pour l'identification selon le procédé d'une des revendications 9 à 11 de molécules utiles dans le traitement des maladies autoimmunes, de certaines maladies neurologiques et des cancers.

Figure 1 : Séquence d'acides aminés du peptide interagissant avec Bcl-2 et Bcl-XL
(SEQ ID N°1)

**Asp-Thr-Arg-Arg-Ser-Met-Val-Phe-Ala-Arg-His-Leu-Arg-Glu-Val-Gly-Asp-Glu-
Phe-Arg-Ser-Arg**

Figure 2 : Séquence d'acides nucléiques codant pour le polypeptide décrit dans la figure 1 (SEQ ID N°2)

**5'-GATACCCGTCGCAGCATGGTGTGGCCAGGCACCTGCGGGAGGTGGG
AGACGAGTTCAGGAGCAGA -3'**

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

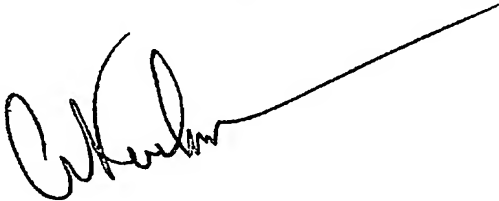
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 2..

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		PEPTIDE-1	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 09 697	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2			
LE(S) DEMANDEUR(S) : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE </div> <div> HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE </div> </div>			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		GENESTE	
Prénoms		Olivier	
Adresse	Rue	11, rue de la Bénarde	
	Code postal et ville	92500	RUEIL MALMAISON
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		HICKMAN	
Prénoms		John	
Adresse	Rue	136, rue de Tocqueville	
	Code postal et ville	75017	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		BENNETT	
Prénoms		Richard	
Adresse	Rue	3, rue Saint Christophe	
	Code postal et ville	75015	PARIS
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 6 août 2003 Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets			

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2. / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		PEPTIDE-1	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 09 697	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) Nouveau peptide interagissant avec Bcl-XL et Bcl-2			
LE(S) DEMANDEUR(S) : LES LABORATOIRES SERVIER 12, Place de la Défense 92415 COURBEVOIE Cedex FRANCE HYBRIGENICS 3-5 Impasse Reille 75014 PARIS FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		RAIN	
Prénoms		Jean-Christophe	
Adresse	Rue	32, jardin Boieldieu	
	Code postal et ville	92800	PUTEAUX
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) le 6 août 2003 Catherine KUEHM-CAUBERE, Ingénieur Brevets			

PCT/FR2004/002081



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ ~~GRAY~~ SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.